

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

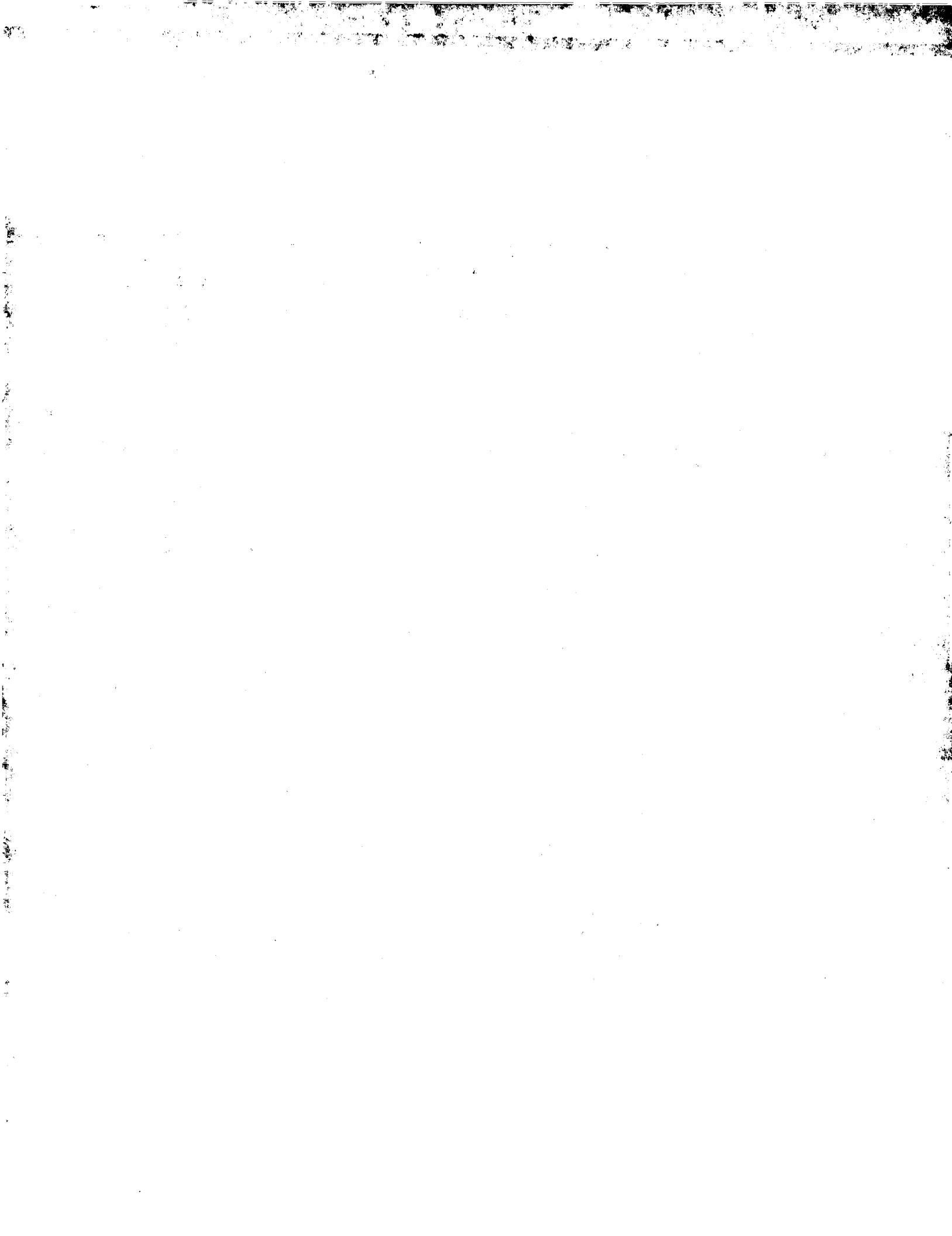
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 408 542 A2**

(19)

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 90890206.7

(51) Int. Cl. 5: **G01N 33/543, G01N 33/53**

(22) Anmeldetag: **09.07.90**

(30) Priorität: **13.07.89 AT 1699/89**

(71) Anmelder: IMMUNO Aktiengesellschaft für
chemisch-medizinische Produkte
Industriestrasse 72
A-1220 Wien(AT)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
16.01.91 Patentblatt 91/03

(72) Erfinder: Alcher, Helmut, Dr.
Theodor Körner Strasse 17
A-2238 Obersiebenbrunn(AT)
Erfinder: Molinari, Ewald, Dr.
Brühlerstrasse 79/3/14
A-2340 Mödling(AT)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI LU NL SE

(74) Vertreter: Wolfram, Gustav, Dipl.-Ing.
Schwindgasse 7 P.O. Box 205
A-1041 Wien(AT)

(54) Verfahren zur Bestimmung von Antigenen und/oder Antikörpern in menschlichen
Körperflüssigkeiten sowie Set zur Durchführung des Verfahrens.

(57) Zur gleichzeitigen Bestimmung einer Mehrzahl von Antigenen und/oder Antikörpern in einer Probe einer menschlichen Körperflüssigkeit wird die Probe in eine Mikrotiterplatte eingebracht, deren Näpfchen mit Antikörpern (Ak_{a1} , Ak_{a2} ...) beschichtet sind, die gegen einen Teil der gesuchten Antigene (Ag_{a1} , Ag_{a2} , ...) gerichtet sind, und wird eine Mehrzahl fester Träger, vorzugsweise in Form eines Kammes, die mit Antikörpern (Ak_{b1} , Ak_{b2} ...) beschichtet sind, die gegen einen anderen Teil der gesuchten Antigene (Ag_{b1} , Ag_{b2} ...) gerichtet sind, mit der Probe in Kontakt gebracht; sodann werden - nach erfolgter Komplexierung - die Näpfchen und die festen Träger von nicht adsorbierten Proteinen freigeswaschen, die in den Näpfchen der Mikrotiterplatte und/oder an den festen Trägern adsorbierten Komplexe (Ak_{a1} - Ag_{a1} ... und/oder Ak_{b1} - Ag_{b1} ...) mit einem Gemisch von markierten Antikörperenzymen ($Ak_{a1}E^*$..., $Ak_{b1}E^*$, ...), die gegen die gesuchten Antigene (Ag_{a1} , Ag_{a2} , ... Ag_{b1} , Ag_{b2} ...), gerichtet sind, inkubiert und wird die Aktivität der an die Komplexe gebundenen Enzyme (Ak_{a1} - Ag_{a1} - $Ak_{a1}E^*$, ... Ak_{b1} - Ag_{b1} - $Ak_{b1}E^*$, ...) nach Umsetzung mit einem färbenden Substrat photometrisch bestimmt.

EP 0 408 542 A2

VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON ANTIGENEN UND/ODER ANTIKÖRPERN IN MENSCHLICHEN KÖRPERFLÜSSIGKEITEN SOWIE SET ZUR DURCHFÜHRUNG DES VERFAHRENS

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Antigenen und/oder Antikörpern in menschlichen Körperflüssigkeiten, durch Bildung eines Antigen/Antikörper-Komplexes, wobei die auf Antigen- bzw. Antikörpergehalt zu prüfende Probe mit einem komplexbildenden Antikörper bzw. Antigen, welcher(s) auf einem Träger in festem Zustand adsorbiert ist, in Kontakt gebracht wird, sowie ein Set zur Durchführung des Verfahrens.

Aus der DE-C - 24 24 465 ist ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung von Hepatitis B-Antigen und dessen Antikörper in Seren bekannt. Das Bestimmungsprinzip ist eine Inhibitionsreaktion, die naturgemäß die Empfindlichkeit des Systems stark herabsetzt.

Die DE-A - 30 21 891 beschreibt ein Verfahren zum gleichzeitigen Nachweis von verschiedenen Hepatitis-Indikatoren, u.zw. Hepatitis B-Oberflächenantigen und einem Antikörper gegen Hepatitis B-Kernantigen. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß die beiden zu bestimmenden Stoffe mit zwei gänzlich verschiedenen Reaktionstypen gesucht werden müssen, wobei der eine Reaktionspartner mit einem radioaktiven Isotop markiert werden muß, während der andere enzymatisch bestimmt wird.

Ganz allgemein muß bei der Bestimmung von mindestens zwei Immunreaktanten auf die strenge Einhaltung einer ganz bestimmten Abfolge von Verfahrensschritten geachtet werden, was naturgemäß die Gefahr von Fehlbestimmungen sehr erhöht. Die Fehlerquelle wird dabei umso größer, je mehr Immunreaktanten bestimmt werden sollen. Dazu kommt noch, daß bei der Bestimmung einer Mehrzahl von Stoffen die Probe entsprechend oft pipettiert werden muß, wodurch die Genauigkeit der Einzelwerte oft nachteilig beeinflußt wird.

Die Erfindung setzt sich zum Ziel, ein einfacher durchzuführendes Verfahren zur Bestimmung einer Mehrzahl von Antigenen und/oder Antikörpern in Proben menschlicher Körperflüssigkeiten zur Verfügung zu stellen, das die oben genannten Nachteile nicht auweist und ohne radioaktive Markierung durchgeführt werden kann.

Dieses Ziel wird bei der gleichzeitigen Bestimmung einer Mehrzahl von Antigenen erfindungsgemäß dadurch erreicht, daß die zu untersuchende Probe, die die Antigene Ag_{a1}, Ag_{a2}, ... Ag_{b1}, Ag_{b2}... enthält, in eine Mikrotiterplatte eingebracht wird, deren Näpfchen mit Antikörpern Ak_{a1}, Ak_{a2}... beschichtet sind, die gegen einen Teil der gesuchten Antigene Ag_{a1}, Ag_{a2}, ... gerichtet sind, und daß eine Mehrzahl fester Träger, vorzugsweise in Form eines Kamms, die mit Antikörpern Ak_{b1}, Ak_{b2}... be-

schichtet sind, die gegen einen anderen Teil der gesuchten Antigene Ag_{b1}, Ag_{b2}... gerichtet sind, mit der Probe in Kontakt gebracht wird; sodann - nach erfolgter Komplexierung - die Näpfchen und die festen Träger von nicht adsorbierten Proteinen freigeswaschen werden, die in den Näpfchen der Mikrotiterplatte und/oder an den festen Trägern adsorbierten Komplexe Ak_{a1}-Ag_{a1}... und/oder Ak_{b1}-Ag_{b1}... mit einem Gemisch von markierten Antikörperenzymen Ak_{a1}E*, ..., Ak_{b1}E*, ..., die gegen die gesuchten Antigene Ag_{a1}, Ag_{a2}, ... Ag_{b1}, Ag_{b2}... gerichtet sind, inkubiert werden und die Aktivität der an die Komplexe gebundenen Enzyme Ak_{a1}-Ag_{a1}-Ak_{a1}E*, ...Ak_{b1}-Ag_{b1}-Ak_{b1}E*, ... nach Umsetzung mit einem färbenden Substrat photometrisch bestimmt wird.

Zur gleichzeitigen Bestimmung einer Mehrzahl von in der zu untersuchenden Probe enthaltenen Antikörpern Ak_{a1}, Ak_{a2} ... Ak_{b1}, Ak_{b2}, ... wird die Probe in eine Mikrotiterplatte eingebracht, deren Näpfchen mit Antigenen Ag_{a1}, Ag_{a2} ... beschichtet sind, die mit einem Teil der gesuchten Antikörper Ak_{a1}, Ak_{a2} ... korrespondieren, und wird eine Mehrzahl fester Träger, vorzugsweise in Form eines Kamms, die mit Antigenen Ag_{b1}, Ag_{b2}, ... beschichtet sind, die mit einem anderen Teil der gesuchten Antikörper Ak_{b1}, Ak_{b2} ... korrespondieren, mit der Probe in Kontakt gebracht; sodann werden - nach erfolgter Komplexierung - die Näpfchen und die festen Träger von nicht adsorbierten Proteinen freigeswaschen, die in den Näpfchen der Mikrotiterplatte und/oder an den festen Trägern adsorbierten Komplexe Ag_{a1}-Ak_{a1} ... und/oder Ag_{b1}-Ak_{b1}... mit einem Gemisch von markierten Antigenenzymen Ag_{a1}E* ... Ag_{b1}E* ..., die mit den gesuchten Antikörpern Ak_{a1}, Ak_{a2}, ... Ak_{b1}, Ak_{b2}, ... korrespondieren, inkubiert und wird die Aktivität der an die Komplexe gebundenen Enzyme Ag_{a1}-Ak_{a1}-Ag_{a1}E* ... Ag_{b1}-Ak_{b1}-Ag_{b1}E*, ... nach Umsetzung mit einem färbenden Substrat photometrisch bestimmt.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann auch gleichzeitig mindestens ein Antikörper Ak_{a1}... und mindestens ein Antigen Ag_{b1}, ... bestimmt werden, indem die verwendeten Näpfchen der Mikrotiterplatte und die verwendeten festen Träger mit dem (den) zu dem (den) gesuchten Antikörper(n) Ak_{a1}, ... bzw. Antigen(en) Ag_{b1}, ... korrespondierend(n) Antigen(en) Ag_{a1}, ... bzw. Antikörper(n) Ak_{b1}, ... beschichtet sind.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann somit eine Mehrzahl von Antikörpern und/oder Antigenen in einer Probe bestimmt werden, wobei die Probe nur ein einziges Mal pipettiert zu werden braucht. Die Gefahr von Pipettierfehlern im tägli-

chen Routinebetrieb wird beim erfindungsgemäßen Verfahren somit auf ein Minimum reduziert.

Die Erfindung betrifft auch ein Set zur Durchführung des Verfahrens, mit einer Mikrotiterplatte und einem in die Näpfchen der Mikrotiterplatte passenden festen Träger, insbesondere einem kammartigen Träger, und ist dadurch gekennzeichnet, daß die Näpfchen der Mikrotiterplatte und die festen Träger mit einem oder mehreren Antigen(en) $Ag_{a1}, Ag_{b1} \dots$ bzw. mit einem oder mehreren Antikörper(n) $Ak_{a1}, Ag_{b1} \dots$ beschichtet sind, welche mit dem (den) gesuchten Antigen(en) und/oder Antikörper(n) Komplexe bilden.

Ein Set, bestehend aus einer Mikrotiterplatte und einem kammartigen Träger zur simultanen radioimmunchemischen Bestimmung eines Antigens und eines Antikörpers ist aus der AT-B - 343.822 bekannt.

Mit den nachfolgenden Beispielen wird die Erfindung noch näher erläutert.

Beispiel 1:

Gleichzeitige Bestimmung von Apo-Lipoprotein-AI (antiatherosklerotisches HD-Lipoprotein) und Apo-Protein-B (atherosklerotisches LD-Lipoprotein) in biologischen Flüssigkeiten

Näpfchen einer Mikrotiterplatte wurden mit 200 μl (pro Näpfchen) einer Lösung eines affinitätsgeeinigten Schafantikörpers gegen Apo-A in einem 0,1 m PBS-Puffer (pH: 7,4) mit einer Antikörperkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 12 Stunden bei Zimmertemperatur behandelt und mit dem Antikörper beschichtet. Danach wurden die Näpfchen mindestens dreimal mit 250 μl PBS-Puffer, enthaltend 0,05 % Tween 20 gewaschen. Allfällige nicht besetzte Bindungsstellen an der Polystyrolwand der Näpfchen wurden durch Zugabe einer 0,2 % w/v Albuminlösung in PBS-Puffer zwei Stunden bei Zimmertemperatur abgesättigt, worauf die Platten neuerlich gewaschen und einer gründlichen Trocknung unter Vakuum unterzogen wurden. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte unter Silikagel.

In ähnlicher Weise wurden die Plättchen des Testkammes mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen Apo-B beschichtet.

Die zu untersuchenden Proben und Standards wurden in PBS-Tween-Puffer 1 : 500 vorverdünnt und in der Mikrotiterplatte unter Zugabe des Testkammes zwei Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Probenvolumen betrug 200 μl . Danach wurden die Näpfchen der Mikrotiterplatte sowie die Testkämme gründlich in PBS-Tween-Puffer gewaschen und 200 μl eines Gemisches aus mit Meerrettichperoxidase markierten gereinigten Antikör-

fern gegen Apo-AI und Apo-B in die Näpfchen pipettiert. Die Testkämme wurden eingesetzt und das Set eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden 5 in die mit anti-apo-AI beschichtete Mikrotiterplatte sowie in eine zweite Mikrotiterplatte, die unbeschichtet war, jeweils 200 μl Tetramethylbenzidin enthaltendes Substrat pipettiert.

Die Testkämme wurden in die zweite Mikrotiterplatte eingesetzt und beide Platten 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurde die Enzymsubstratreaktion in beiden Platten durch Zugabe von 50 μl 4 n Schwefelsäure gestoppt. Mit Hilfe eines Photometers wurden die Extinktionen der einzelnen Proben in beiden Platten bei 450 nm gemessen und die Konzentrationen an Apo-AI und Apo-B in den Proben durch Vergleich mit den mitgeführten Standards ermittelt.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann 20 auch der Quotient der Konzentrationen der korrespondierenden Proben gebildet werden, was für die medizinische Diagnose bzw. Prognose von Bedeutung ist.

Beispiel 2:

Gleichzeitige Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen FSME, IgG-Antikörpern gegen FSME und Antikörpern gegen Borrelia-Burgdorferie

Näpfchen einer Mikrotiterplatte würden analog Beispiel 1 mit einer gereinigten Virus-Suspension 35 von FSME-Antigen und die Plättchen der Kämme mit einer Suspension von Borrelia-Burgdorferie-Antigen beschichtet. In die Mikrotiterplatte wurden 200 μl einer 1 : 50-Verdünnung der Proben vorgelegt, die Testkämme eingesetzt und das Set zwei Stunden bei 45 °C inkubiert. Die Näpfchen der Mikrotiterplatte und die Testkämme wurden gewaschen, in die beschichtete Mikrotiterplatte ein Gemisch von Anti-human IgG, markiert mit alkalischer Phosphatase (Enzym 1), und FSME-Antigen, markiert mit Meerrettichperoxidase (Enzym 2), pipettiert.

In eine zweite, unbeschichtete Mikrotiterplatte wurde ebenfalls anti-Human IgG, mit Enzym 1 markiert, vorgelegt, und die Testkämme wurden eingesetzt. Beide Platten wurden eine Stunde bei 45 °C inkubiert, die Platten sowie die Testkämme nochmals gewaschen, und in die beschichtete Mikrotiterplatte wurde ein Gemisch von o-Phenyldiamin und p-Nitrophenylphosphat (PNPP) in geeigneter gepufferter Lösung einpipettiert.

In die zweite Platte wurde PNPP vorgelegt und die Testkämme wurden eingesetzt. Beide Platten wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und

danach die Testkämme verworfen. Die Reaktion in Platte 2 wurde durch Zugabe von 50 µl 4 n Schwefelsäure gestoppt. Bei Platte 1 wurden in einem geeigneten Photometer die Extinktionen in den einzelnen Nüpfchen gemessen (Messung der Enzymsubstratextinktion des Enzyms 1 bei 405 nm; danach wurden 50 µl 4 n Schwefelsäure zugegeben und die Enzymsubstrat-Extinktionen des Enzyms 2 bei 492 nm gemessen).

Die Extinktionen von Enzym-Substrat Nr. 1 entsprechen dem Anti-FSME-IgG Gehalt der Probe, die Extinktionen von Enzym-Substrat Nr. 2 entsprechen dem Anti-FSME-IgM Gehalt der Probe.

In einem nächsten Schritt erfolgte die Messung der Extinktionen in Platte 2 bei der für das Enzym 1 geeigneten Wellenlänge (405 nm). In Platte Nr. 2 entsprechen die gemessenen Extinktionen dem Gehalt an IgG-Antikörpern gegen Borrelia-Burgdorferie.

Somit ist es möglich, in einem einzigen Testansatz einen Überblick über allfällige Infektionen durch FSME und/oder Borrelia-Burgdorferie zu erhalten.

Ansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Antigenen in menschlichen Körperflüssigkeiten, durch Bildung eines Antigen/Antikörper-Komplexes, wobei die auf Antigengehalt zu prüfende Probe mit einem komplexbildenden Antikörper, welcher auf einem Träger in festem Zustand adsorbiert ist, in Kontakt gebracht wird, dadurch gekennzeichnet, daß zur gleichzeitigen Bestimmung einer Mehrzahl von in der zu untersuchenden Probe enthaltenen Antigenen ($Ag_{a1}, Ag_{a2}, \dots, Ag_{b1}, Ag_{b2} \dots$) die Probe in eine Mikrotiterplatte eingebracht wird, deren Nüpfchen mit Antikörpern ($Ak_{a1}, Ak_{a2} \dots$) beschichtet sind, die gegen einen Teil der gesuchten Antigene (Ag_{a1}, Ag_{a2}, \dots) gerichtet sind, und daß eine Mehrzahl fester Träger, vorzugsweise in Form eines Kammes, die mit Antikörpern ($Ak_{b1}, Ak_{b2} \dots$) beschichtet sind, die gegen einen anderen Teil der gesuchten Antigene ($Ag_{b1}, Ag_{b2} \dots$) gerichtet sind, mit der Probe in Kontakt gebracht wird; sodann - nach erfolgter Komplexierung - die Nüpfchen und die festen Träger von nicht adsorbierten Proteinen freigeswaschen werden, die in den Nüpfchen der Mikrotiterplatte und/oder an den festen Trägern adsorbierten Komplexe ($Ak_{a1}-Ag_{a1} \dots$ und/oder $Ak_{b1}-Ag_{b1} \dots$) mit einem Gemisch von markierten Antigenenzymen ($Ag_{a1}E^* \dots, Ag_{b1}E^* \dots$), die gegen die gesuchten Antigene ($Ag_{a1}, Ag_{a2}, \dots, Ag_{b1}, Ag_{b2} \dots$) gerichtet sind, inkubiert werden und die Aktivität der an die Komplexe gebundenen Enzyme ($Ag_{a1}-Ak_{a1}-Ag_{a1}E^* \dots, Ag_{b1}-Ak_{b1}-Ag_{b1}E^*, \dots$) nach Umsetzung mit einem färbenden Substrat photometrisch bestimmt wird.

2. Verfahren zur Bestimmung von Antikörpern in menschlichen Körperflüssigkeiten, durch Bildung eines Antikörper/Antigen-Komplexes, wobei die auf Antikörpergehalt zu prüfende Probe mit einem komplexbildenden Antigen, welches auf einem Träger in festem Zustand adsorbiert ist, in Kontakt gebracht wird, dadurch gekennzeichnet, daß zur gleichzeitigen Bestimmung einer Mehrzahl von in der zu untersuchenden Probe enthaltenen Antikörpern ($Ak_{a1}, Ak_{a2} \dots, Ak_{b1}, Ak_{b2} \dots$) die Probe in eine Mikrotiterplatte eingebracht wird, deren Nüpfchen mit Antigenen ($Ag_{a1}, Ag_{a2} \dots$) beschichtet sind, die mit einem Teil der gesuchten Antikörper ($Ak_{a1}, Ak_{a2} \dots$) korrespondieren, und daß eine Mehrzahl fester Träger, vorzugsweise in Form eines Kammes, die mit Antigenen (Ag_{b1}, Ag_{b2}, \dots) beschichtet sind, die mit einem anderen Teil der gesuchten Antikörper ($Ak_{b1}, Ak_{b2} \dots$) korrespondieren, mit der Probe in Kontakt gebracht wird; sodann - nach erfolgter Komplexierung - die Nüpfchen und die festen Träger von nicht adsorbierten Proteinen freigeswaschen werden, die in den Nüpfchen der Mikrotiterplatte und/oder an den festen Trägern adsorbierten Komplexe ($Ag_{a1}-Ak_{a1} \dots$ und/oder $Ag_{b1}-Ak_{b1} \dots$) mit einem Gemisch von markierten Antigenenzymen ($Ag_{a1}E^* \dots, Ag_{b1}E^* \dots$), die mit den gesuchten Antikörpern ($Ak_{a1}, Ak_{a2}, \dots, Ak_{b1}, Ak_{b2}, \dots$) korrespondieren, inkubiert werden und die Aktivität der an die Komplexe gebundenen Enzyme ($Ag_{a1}-Ak_{a1}-Ag_{a1}E^* \dots, Ag_{b1}-Ak_{b1}-Ag_{b1}E^*, \dots$) nach Umsetzung mit einem färbenden Substrat photometrisch bestimmt wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur gleichzeitigen Bestimmung mindestens eines Antikörpers (Ak_{a1}, \dots) und mindestens eines Antigens (Ag_{b1}, \dots) in der Probe die Nüpfchen der Mikrotiterplatte und die festen Träger mit dem (den) zu dem (den) gesuchten Antikörper(n) (Ak_{a1}, \dots) bzw. Antigen(en) (Ag_{b1}, \dots) korrespondierendem(n) Antigen(en) (Ag_{a1}, \dots) bzw. Antikörper(n) (Ak_{b1}, \dots) beschichtet ist (sind).
4. Set zur Durchführung des Verfahrens nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, mit einer Mikrotiterplatte und einem in die Nüpfchen der Mikrotiterplatte passenden festen Träger, insbesondere einem kammartigen Träger, dadurch gekennzeichnet, daß die Nüpfchen der Mikrotiterplatte und die festen Träger mit einem oder mehreren Antigen(en) ($Ag_{a1}, Ag_{b1} \dots$) bzw. mit einem oder mehreren Antikörper(n) ($Ak_{a1}, Ak_{b1} \dots$) beschichtet ist (sind), welche mit dem (den) gesuchten Antigen(en) und/oder Antikörper(n) Komplexe bilden.



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 408 542 A3**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(21) Anmeldenummer: **90890206.7**

(51) Int. Cl.⁵: **G01N 33/53, G01N 33/543**

(22) Anmeldetag: **09.07.90**

(30) Priorität: **13.07.89 AT 1699/89**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
16.01.91 Patentblatt 91/03

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI LU NL SE

(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: **13.01.93 Patentblatt 93/02**

(71) Anmelder: **IMMUNO Aktiengesellschaft
Industriestrasse 67
A-1221 Wien(AT)**

(72) Erfinder: **Aicher, Helmut, Dr.
Theodor Körner Strasse 17
A-2238 Obersiebenbrunn(AT)**
Erfinder: **Molinari, Ewald, Dr.
Brühlerstrasse 79/3/14
A-2340 Mödling(AT)**

(74) Vertreter: **Wolfram, Gustav, Dipl.-Ing.
Patentanwälte Sonn, Pawloy, Weinzinger &
Wolfram, Riemergasse 14
A-1010 Wien(AT)**

(54) **Verfahren zur Bestimmung von Antigenen und/oder Antikörpern in menschlichen
Körperflüssigkeiten sowie Set zur Durchführung des Verfahrens.**

(57) Zur gleichzeitigen Bestimmung einer Mehrzahl von Antigenen und/oder Antikörpern in einer Probe einer menschlichen Körperflüssigkeit wird die Probe in eine Mikrotiterplatte eingebracht, deren Näpfchen mit Antikörpern (Ak_{a1} , Ak_{a2} ...) beschichtet sind, die gegen einen Teil der gesuchten Antigene (Ag_{a1} , Ag_{a2} , ...) gerichtet sind, und wird eine Mehrzahl fester Träger, vorzugsweise in Form eines Kamms, die mit Antikörpern (Ak_{b1} , Ak_{b2} ...) beschichtet sind, die gegen einen anderen Teil der gesuchten Antigene (Ag_{b1} , Ag_{b2} ...) gerichtet sind, mit der Probe in Kontakt gebracht; sodann werden - nach erfolgter Komplexierung - die Näpfchen und die festen Träger von nicht adsorbierten Proteinen freigeswaschen, die in den Näpfchen der Mikrotiterplatte und/oder an den festen Trägern adsorbierten Komplexe (Ak_{a1} - Ag_{a1} ... und/oder Ak_{b1} - Ag_{b1} ...) mit einem Gemisch von markierten Antikörperenzymen ($Ak_{a1}E^*$..., $Ak_{b1}E^*$...), die gegen die gesuchten Antigene (Ag_{a1} , Ag_{a2} , ... Ag_{b1} , Ag_{b2} ...) gerichtet sind, inkubiert und wird die Aktivität der an die Komplexe gebundenen Enzyme (Ak_{a1} - Ag_{a1} - $Ak_{a1}E^*$, ... Ak_{b1} - Ag_{b1} - $Ak_{b1}E^*$, ...) nach Umsetzung mit einem färbenden Substrat photometrisch bestimmt.

EP 0 408 542 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 89 0206

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrieb Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
Y	EP-A-0 042 755 (UNILEVER) * Seite 8, Zeile 12 - Zeile 31; Abbildung 3 * * Seite 24, Zeile 9 - Zeile 15 * ---	1-4	G01N33/53 G01N33/543
Y	WO-A-8 303 677 (GENEFUSION) * Seite 14, Zeile 2 - Seite 15, Zeile 3 * ---	1-4	
Y	GB-A-2 051 357 (ABBOTT LABORATORIES) * das ganze Dokument * ---	1-4	
A	BIOTECHNIQUES Bd. 6, Nr. 4, 1. April 1988, NATICK MA USA Seiten 299 - 303 T. OBATA ET AL. 'Strip-comb dot immunoblotting: a rapid, easy and sensitive method to screen monoclonal antibodies.' * Seite 299, Spalte 1, Zeile 29 - Zeile 31; Abbildung 1 * -----	1-4	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5) G01N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Rechercheort DEN HAAG	Abschlußdatum der Recherche 16 NOVEMBER 1992	Prüfer VAN BOHEMEN C.G.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldeatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument A : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			